

Objetivo específico II:

b. Desarrollar nuevos modelos de erosiones corneales en cobayos y estudiar el proceso de recuperación, con el objetivo de utilizarlos como uno de los factores ambientales desfavorables, en un modelo experimental crónico.

INTRODUCCIÓN

Debido a su exposición y transparencia, los daños en la superficie ocular constituyen la consulta oftalmológica más común y el desarrollo de erosiones recurrentes en una subpoblación de pacientes con daño superficial. El tratamiento para erosiones corneales recurrentes comienza con el desbridamiento del área alrededor del sitio de lesión. Una combinación de desbridamiento con pulido con punta de diamante de la zona de la membrana basal del epitelio, queratectomía con láser o delaminación empleando alcohol son empleados en pacientes con erosiones recurrentes (188-190)

Existen numerosos trabajos relacionados con la realización de una herida corneal de profundidad definida para evaluar la pérdida de células, la reepitelización, la disposición de las fibras de colágeno, los cambios en los tipos de colágeno según la etapa de cicatrización, la presencia de factores que regulan la cicatrización, la expresión de diferentes metaloproteinasas de matriz (MMPs), la aparición de miofibroblastos, la infiltración celular, factores de señalización, inhibición, y muchísimos otros factores que han sido estudiados y que siguen siendo investigados para comprender y prevenir o curar algunas patologías oculares (1, 191-194).

Entre los distintos métodos encontrados en la bibliografía, uno de ellos consiste en provocar una herida por desbridamiento, es decir retirando el epitelio corneal manteniendo intacta la membrana basal, a diferencia de la queratectomía donde ésta es eliminada (191-192). Para preservar la membrana basal, se utiliza un espátula roma que elimina el epitelio dentro de una zona marcada con un trépano. (195-196). Las heridas con desbridamiento en forma circular son ideales para algunos análisis, como la cuantificación de re-epitelización, las tasas de proliferación celular, re-inervación, y estudiar la respuesta inmune innata (193). La re-epitelización se produce a través de movimientos laminares, el borde de inicio es sólo de 1 o 2 capas de células y los hemidesmosomas se desmontan durante la migración. Las heridas por desbridamiento corneal son ideales para estudios a corto plazo de la tasa de migración celular y erosiones recurrentes en ratones (191).

En el ratón, especie utilizada como modelo en la que se ha estudiado ampliamente el proceso de cicatrización corneal, las heridas por desbridamiento reepitelizan rápidamente, pero también pueden conducir a erosiones recurrentes a través de mecanismos que implican sobreexpresión de MMP-9 de las células epiteliales corneales. MMP-9, junto a MMP-2, son dos metaloproteinasas de suma importancia en la remodelación y degradación del colágeno estromal. La MMP-2 es sintetizada por queratocitos corneales y realiza una función de vigilancia en la córnea normal, llegando a ser localmente activada para degradar las moléculas de colágeno, que en ocasiones se dañan. Por otra

parte, la MMP-9 producida por las células epiteliales y neutrófilos polimorfonucleares, es de importancia central en la remodelación de la matriz extracelular luego de una herida profunda en la superficie corneal y ha sido implicada en la patogénesis de la ulceración corneal estéril entre otras patologías oculares (197). MMP-9 puede degradar la integrina $\alpha 6\beta 4$ (una proteína integral de membrana dentro de los hemidesmosomas que median la adhesión de células epiteliales a la membrana basal adyacente, (198)) al clivar el ectodominio $\beta 4$, promoviendo de este modo las erosiones corneales recurrentes. Mientras que el exceso de MMP-9 contribuye a la formación de la erosión, antagónicamente es necesaria para la curación de la herida corneal eficiente, ya que los ratones que carecen de MMP-9 curan mal (135). Otra metaloproteínasa de importancia en el proceso de reepitelización corneal es la MMP-10, también conocida como estromelisin-2, la que puede degradar colágeno no fibrilar, proteoglicanos y elastina (entre otros) *in vitro* (199). En un modelo de reepitelización corneal en ratones, Gordon y col estudiaron la participación de distintas MMPs, entre ellas la MMP-10, observando que esta se encontraba sobreexpresada, ubicándose justo detrás del frente migratorio de células epiteliales (198). También observaron en ratones knock-out para esta MMP, que cambios en la expresión de la misma no afecta significativamente la proliferación o velocidad de migración celular. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos en estudios de sobreexpresión de MMP-10 (200). Por lo cual, se requiere más investigación para determinar la función precisa de MMP-10 en el proceso de reepitelización corneal.

Las heridas por desbridamiento no activan la expresión de actina de músculo liso (α -SMA) en los fibroblastos estromales en el ratón. Heridas más profundas que alteran la membrana basal, tales como la queratectomía y las incisiones de espesor completo se deben utilizar para evaluar la formación de miofibroblastos. Cuando hay muchos miofibroblastos, la opacidad de las células y la matriz extracelular desorganizada que ellos producen, puede generar opacidad corneal. Los miofibroblastos tienen características de células musculares lisas, como alta expresión de α -SMA que se puede usar como marcador. El empleo de una fresa rotativa en ratón, genera pérdida de membrana basal. Factores como la velocidad de la rotación, la fuerza aplicada sobre la superficie corneal, el ángulo de la fresa con relación a la superficie ocular, y el tiempo de aplicación de la fresa en la córnea impactan en la magnitud de la membrana basal eliminada (192). También se han usado la queratotomía superficial manual (MSK) y las heridas por queratectomía fotorrefractiva (acrónimo del inglés PRK). En estos casos, la cicatrización de la herida incluye reepitelización sobre la membrana basal, la reinervación, y la cicatrización de la córnea. Las células positivas para α -SMA que se generan por este tipo de heridas son transitorias, y permanecen durante un tiempo variable (201).

Además de los tipos de lesión corneal mencionados, se emplean otros tales como: heridas incisionales (202-203), que pueden inducir proliferación de miofibroblastos y cicatrices en la córnea; suturas colocadas en la córnea central, que inducen una respuesta inmune y conducen a inducción de la angiogénesis (204); aplicación de un papel de filtro o celulosa sobre la superficie ocular y su posterior remoción, lo que ocasiona pérdida de células. El último método mencionado, llamado citología de impresión, es utilizado para diagnosticar deficiencia de células troncales de la cornea. También se pueden inducir lesiones químicas en la córnea, utilizando papeles de filtro humedecidos con productos químicos (205).

Los conejos también han sido utilizados para estudiar la cicatrización de heridas de la córnea debido a que el tamaño de ésta es similar a la del hombre; esto permite a los médicos especialistas utilizar los mismos instrumentos y métodos de evaluación que utilizan en los pacientes. Los modelos en conejo fueron fundamentales en los estudios que condujeron a la implementación clínica de los procedimientos de PRK y queratomileusis in situ asistida por láser (acrónimo del inglés LASIK) (206). La córnea del conejo responde de manera similar a la córnea humana en términos de la sincronización, el grado de cicatrización, y formación de miofibroblastos (207-208). Las desventajas de realizar investigaciones en conejos en lugar de ratones incluyen: mayor costo en la compra y mantenimiento, disponibilidad restringida de anticuerpos contra diversas proteínas de interés, y menor disponibilidad de cepas genéticamente diversas y animales transgénicos.

Una preocupación importante al estudiar la córnea utilizando ratones es la elección de la cepa de ratón. Las diferentes cepas de ratones tienen córneas que cicatrizan más fácilmente que otras y estas diferencias también se deben tomar en cuenta al planificar los experimentos. Un estudio realizado por Singh y col. reveló que los ratones DBA / 2J tienen más miofibroblastos α -SMA -positivos, células cuya presencia se asocia con cicatrización activa en la córnea, que BALB / c, C57BL6 o ratones C3H después de PRK irregular con un láser excimer (209). En general, la cicatrización corneal es menos severa en ratones en comparación con ratas y conejos.

Aunque hay muchas ventajas en el uso de ratones genéticamente modificados para los estudios de curación de heridas de la córnea, también hay algunas desventajas. Los inconvenientes más importantes son: tiempo y costos para desarrollarlos, y el pequeño tamaño de la córnea del ratón (210).

La tecnología del láser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation o Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación) emplea haces intensos y estrechos de luz, y permite realizar lesiones reproducibles, disminuyendo el factor de operador-dependiente.

Si bien los láseres han ido cobrando auge en la medicina moderna, su potencial aplicación aún tiene límites desconocidos. Tienen diversas aplicaciones generales, entre las que podemos mencionar: cortar, coagular, fotocauterizar, estimular tejidos, etc. Desde luego, que cada láser tiene su campo de acción, diversificándose en las diferentes ramas de la medicina actual. De esta forma, por ejemplo, en oftalmología los más utilizados son: el Argón, Nd-YAG, Diodo y Excimer Láser.

En esta parte del trabajo utilizamos los láseres de Argón, dióxido de carbono (CO₂), Diodo y Nd-Yag. Todos estos láseres, a pesar de tener un material activo diferente, pueden producir un daño térmico en la superficie donde se haga foco al disparar. De esta manera el daño es factible de controlar con la iluminación adecuada mediante el uso de lámpara de hendidura.

Existen algunos antecedentes bibliográficos sobre el uso de distintos láseres en investigación oftalmológica:

Láser de argón: está basado en el uso del gas argón y tiene afinidad por los epitelios pigmentarios y la hemoglobina. Su efecto es fototérmico, y se lo utiliza ampliamente en patologías retinianas, como por ejemplo en los desgarros retinianos, retinopatía diabética, oclusiones vasculares, etc. Tiene una longitud de onda con dos picos de emisión en onda continua de 488 y 514 nm. Vieira y col., (211) emplearon este láser, con foco intraestromal, para retirar suturas de la córnea, con una potencia de 340 mW, 0,1 seg, y diámetro de 5 a 100 µm, sin observar úlceras ni infecciones. Kremer y col.(212), estudiaron el efecto del láser de argón de 514 nm, en cornea teñida con rosa de bengala y expuesta a diferentes niveles de potencia, diámetro del disparo, y tiempo de exposición. La histología reveló desde una mínima coagulación del tejido a bajas potencias, hasta ruptura lamelar a altas potencias.

Láser de CO₂: El medio activo está formado por partículas de gas carbónico. Se lo emplea en oftalmología para blefaroplastía y se puede usar como herramienta de corte y coagulación. La potencia puede llegar a un máximo de 100 W y su longitud de onda es de 10600 nm. El láser de CO₂ es un láser de tipo portátil con puntas de distancia focal de longitud determinada invariables, lo cual permite su objetividad total. Varios autores han investigado el láser de CO₂ en la córnea bovina, porcina, de conejo y humana y sus informes indican que se observan cambios en el epitelio y en el estroma corneal cuando se examinan al microscopio óptico. (213-214). Bernard Spiess informa sobre el uso clínico de láser de CO₂ comparado con láser Diodo en oftamología veterinaria (215). La fotoqueratotomía con láser de CO₂ también se ha empleado en perros para el tratamiento de la úlcera indolente o erosión corneal recurrente (216).

Láser Diodo: Los más utilizados en oftalmología tienen una longitud de onda en el espectro del verde y el rojo. Posee gran afinidad por la hemoglobina, y también en el área oftalmológica es ampliamente utilizado, pese a que su daño térmico es mayor que el de los demás, siendo una herramienta útil en patologías retinianas como las tratadas por el láser de argón. Chew y col. (217) compararon la transmisibilidad del láser diodo versus el láser de argón sobre los efectos fototérmicos en córnea e iris, enfocando en el estroma medio de la córnea, y concluyeron que para la iridotomía es mejor el láser Diodo porque atraviesa la córnea sin producir daño en la misma, actuando sobre el iris.

Láser de Nd-YAG: (neodymium-doped yttrium aluminium garnet) Su longitud de onda es de 1060 nm (infrarrojo), y el mecanismo de acción consiste en la emisión de pulsos muy cortos de luz de un alto poder que provocan una explosión debido a la ionización del tejido que queda convertido en plasma. Tiene gran afinidad por el agua intra y extracelular. Se aplica en el tratamiento oftalmológico de la opacificación capsular tras cirugía de cataratas, para realizar iridotomía, y para seccionar bridas vítreas, entre otras cosas (218).

En esta parte de la investigación probamos distintos tipos de láser de uso en oftalmología en diferentes condiciones experimentales (potencia, tiempo de exposición, diámetro de disparo) para seleccionar un láser y una condición que produzca una lesión corneal que afecte epitelio y estroma superficial y que no deje cicatrices. Además, estudiamos erosiones corneales por desbridamiento y queratectomía empleando una fresa rotativa, y también observamos la recuperación de las córneas erosionadas.

Elegimos al cobayo como animal de experimentación para producir lesiones corneales superficiales y estudiar su recuperación por varios motivos:

1. es un animal sumamente dócil, de relativo bajo costo de mantenimiento;
2. al igual que los humanos, necesita incorporar ácido ascórbico (AA) en su dieta para que se concentre en la córnea y cumpla importantes funciones contra la RUV;
3. y por la similitud estructural de la córnea entre ambas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cobayos hembras pigmentados cepa Americana o albinos cepa Ssi:Al, provenientes del Bioterio del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, de entre 3 y 5 meses

de edad. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de nuestro instituto, y se los distribuyó en corrales con el piso cubierto de aserrín.

Los cobayos fueron alimentados diariamente (5% del peso del animal) con alimento Conejo Casero, Cargill, Pilar, Córdoba, Argentina, y agua ad libitum suplementada con AA (10 mg/Kg al día) para un normal desarrollo. La temperatura de la habitación fue mantenida a 22°C y se programaron ciclos de 12 hrs de luz (tubos fluorescentes de 36W) y de 12 hrs de oscuridad.

El protocolo de experimentación fue aprobado por la comisión de evaluación de protocolos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución del Honorable Consejo Directivo 122/08), y los animales fueron tratados de acuerdo a lo establecido en los estatutos de Uso de Animales Para la Investigación en Visión y Oftalmología de ARVO (EE.UU.).

Solo se incluyeron animales libres de patologías oculares en el segmento anterior luego de ser examinados con lámpara de hendidura portátil y tinción con fluoresceína.

Instrumental para producir lesiones corneales

Los equipos empleados en esta etapa fueron los siguientes:

- Láser

1. Láser Argón (Novus 2000 , Coherent, Santa Clara, CA, EE.UU.).
2. Láser de Dióxido de Carbono (Smartoffice+, Deka, Calenzano, Firenze, Italia).
3. Láser Diodo (Microlase SL, Keeler, Broomall, PA, EE.UU.).
4. Láser de Nd-YAG (Coherent 7970 Yag Láser, Coherent, Santa Clara, CA, EE.UU.).

- Fresa

Fresa rotativa Algerbrush II (Accutome Inc, Malvern, PA, EE. UU.) con punta de 0,5 mm de diámetro.

Diseño experimental I

Ambos ojos de 4 grupos de cobayos (n=2, cada grupo) fueron tratados con los siguientes láseres con distintas potencias y tiempos de exposición. (**Grupo 1:** Láser Argón, **Grupo 2:** Láser Dióxido de

Carbono, **Grupo 3:** Láser Diodo y **Grupo 4:** Láser Nd-Yag) (ver **tablas 4-7**). Un grupo de 2 animales no fue tratado con láser (control). Los animales fueron anestesiados con ketamina 5mg/kg (FADA Pharma, Buenos Aires, Argentina; i.m.), asociado a proparacaína tópica (Anestalcon®, Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina), y se le instiló fluoresceína al 50% tópica (Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) previa a la realización de 15 disparos de láser en la zona central de la córnea con foco en el epitelio. Luego de ser evaluados por biomicroscopía (BM), a la hora post disparo los cobayos fueron sacrificados utilizando una sobredosis de ketamina y las córneas estudiadas por microscopía óptica (MO).

Diseño experimental II

En esta parte de la investigación utilizamos varios grupos de animales sanos (n=3 en cada grupo). Siete grupos tratados con láser de argón (utilizando diferentes condiciones) y localizando los disparos en la córnea central, y un grupo control (**tabla 7**).

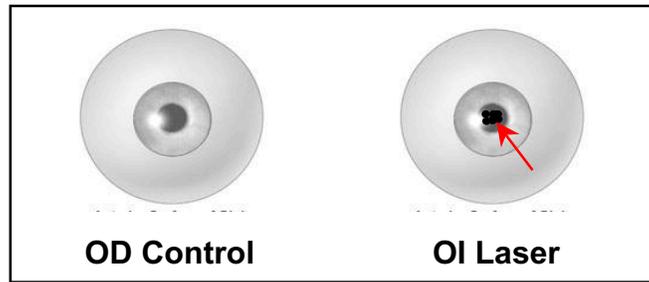
Grupo	Potencias (mW)	Tiempo de exposición	Diámetro del disparo (µm)	# de disparos
1	500	0,3	50	7
2	400	0,3	50	7
3	350	0,3	50	7
4	350	0,3	50	15
5	300	0,3	50	7
6	150	0,3	50	7
7	100	0,3	50	7

Tabla 7. Diferentes grupos de animales y las variables utilizadas en cada grupo experimental.

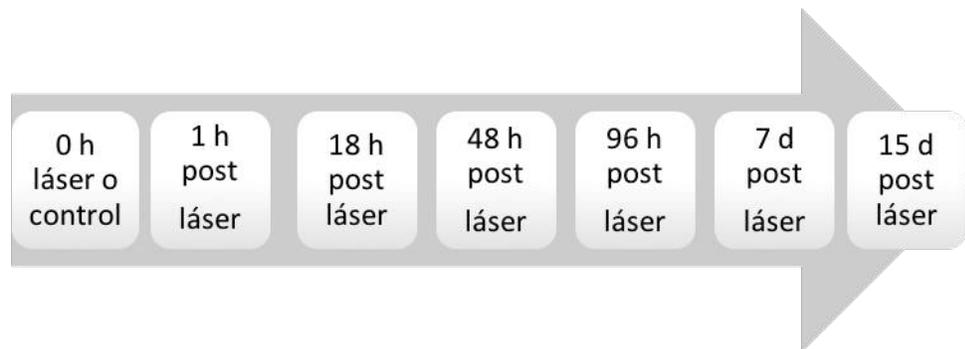
Luego de la realización de los disparos, el estudio de las alteraciones corneales se realizó a los siguientes intervalos de tiempo: 1 h, 18 h, 7 d, 14 d y 21 d, utilizando BM y tomografía de coherencia óptica ((acrónimo del inglés OCT) Visante, Carl Zeiss).

Diseño experimental III

De las diferentes variables de aplicación de láser argón se eligió una, y los OI de 7 cobayos sanos fueron expuestos a 15 disparos del láser argón (esquema abajo, con flecha roja señalando la zona de disparos) con una potencia de 350 mW, 0,3 segundos de tiempo de exposición y 50 µm de diámetro de disparo. Los OD de dichos animales se utilizaron como controles.



Durante un período de 15 días se realizaron diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* a distintos tiempos luego de producidas las lesiones con el láser argón, como se detalla en el siguiente diagrama.



En la **tabla 8** se indican los estudios que se realizaron después de la aplicación del láser argón sobre las córneas lesionadas (OI) y sobre las córneas controles (OD).

	0 h Control	1 h post láser	18 h post láser	48 h post láser	96 h post láser	7 días post láser	15 días post láser
BM	•	•	•			•	•
OCT	•	•	•			•	
Extracción de córneas	•	•	•	•	•	•	•
MO	•		•	•	•	•	
ME	•	•	•			•	•

Tabla 8: Se indica con un punto (.) los diferentes tiempos en que se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro*, luego de la aplicación del láser. BM=biomicroscopía; OCT= tomografía de coherencia óptica; MO= microscopía óptica; ME= microscopía electrónica

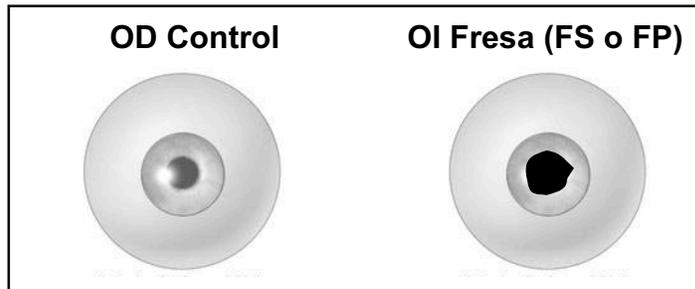
Diseño experimental IV

Se utilizaron 12 cobayos con iguales características que las de los animales empleados en los estudios anteriores, es decir, sanos y acondicionados en jaulas adecuadas.

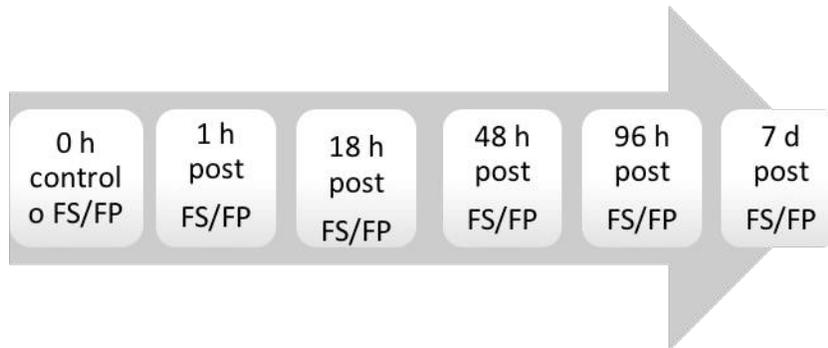
A los OI se les produjo una erosión utilizando la fresa rotativa (Algerbrush II) en la zona central de la córnea bajo las siguientes condiciones:

- Manteniendo la membrana basal (fresa superficial, FS), es decir erosión por desbridamiento.
- Eliminando la membrana basal (fresa profunda, FP), lesión por queratectomía.

Los OD se utilizaron como controles.



Este estudio duró 7 días, durante los cuales se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* a intervalos de tiempo que se detallan en el siguiente diagrama.



	0 h Control	1 h post láser	18 h post láser	48 h post láser	96 h post láser	7 d post láser
BM	•	•	•			•
OCT	•	•	•			•
Extracción de córneas	•	•	•	•	•	•
MO	•	•	•	•	•	•

Tabla 9: Se indica con un punto (.) los diferentes tiempos en que se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro*, luego de la aplicación de la fresa.

Estudios *in vivo*

Biomicroscopía

En este trabajo se empleó el biomicroscopio o lámpara de hendidura portátil XL-1, Shin Nipon, Ohira Co., Niigata, Japan con magnificación de 10X. El posicionamiento del cobayo se hizo en la mayoría de los casos, solo con sujeción manual. La restricción farmacológica del cobayo, cuando fue necesaria, se hizo mediante la utilización de clorhidrato de ketamina inyectable intramuscular (IM, 12 mg/kg). Se utilizó solución de proparacaína al 0.5% para anestesiarse las córneas de los cobayos y solución de fluoresceína al 0,5%, para evidenciar las lesiones con la lámpara de hendidura y luz de cobalto. Se registraron con fotografías a cada uno de los cobayos sometidos a los diferentes tipos de láser.

Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Visante

Las corneas de los cobayos fueron examinadas con OCT Visante (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), previa sedación con ketamina IM (12 mg/kg), mediante sujeción manual, ya que no contamos con dispositivos que adapten el ojo del animal al cabezal del equipo. Se adquirieron imágenes en modo “alta resolución” y con el software del equipo (Visante Tech software, versión 3.0.1.8) se realizaron mediciones de espesor corneal.

Estudios *in vitro*

Microscopia Óptica (MO)

Esta metodología ya fué descrita en MATERIALES Y METODOS de la **parte II a** de esta tesis.

Microscopía Electrónica (ME)

Las córneas para ME se fijaron por inmersión en el fijador de Karnovsky que contenía glutaraldehído al 1,5 % v/v y paraformaldehído al 4% w/v en solución de cacodilato 0,1 M; luego fueron fijadas en tetróxido de osmio 1%. El tejido luego se deshidrató y se embebió en araldita. Se realizaron cortes con el ultramicrotomo JEOL JUM-7 y se montaron en grillas de níquel. Luego las muestras fueron contrateñidas con acetato de uranilo y citrato. Estas secciones fueron examinadas utilizando el microscopio de transmisión electrónica LEO 906E (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania)

Western Blot

La técnica de WB se utilizó en esta etapa para estudiar la expresión de MMP-9 y MMP-10. Células epiteliales de córnea de cobayo fueron homogenizadas manualmente en 200uL de buffer de lisis celular conteniendo 25 mM Tris, 0,25M sucrosa (pH 7.4), 0,5 µg/ml de leupeptina, 0,5 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de pepstatina, y 100 µg/ml de fluoruro difenilmetanosulfonilo (Sigma). Los lisados fueron sonicados durante 5 segundos en hielo en un sonicador (Labsonic 1510 B-Braun, Melsungen, Germany), luego enfriados por 5 s en hielo. Este ciclo se repitió tres veces. Los lisados fueron centrifugados a 12000 g durante 10 min a 4°C. Se tomó la fracción sobrenadante, donde se midió la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford, usando albúmina sérica bovina como estándar.

Las proteínas (a iguales concentraciones) fueron separadas primero mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente, transferidas a una membrana de nitrocelulosa, mediante la aplicación de un campo eléctrico (100 V durante 80 minutos), perpendicular al gel.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con buffer de bloqueo (50 mM Tris/150 NaCl, pH 7,5, conteniendo 0,1 % Tween-20 y 5 % leche descremada) por una hora a temperatura ambiente.

Como anticuerpos primarios, se utilizaron Ac. de conejo anti-cobayo MMP-9 (1:250; Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.), Ac. de conejo anti-ratón MMP-10 (1:250; Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), y como control . Las proteínas marcadas fueron visualizadas usando un Ac secundario carnero anti-conejo marcado con peroxidasa (1:5000, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), y detectadas por quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas fue realizado utilizando el software Image J (NIH).

Estudios estadísticos

Los resultados fueron comparados utilizando el test *t* de Student, y el Test de ANOVA considerando diferencia significativa un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Lesiones producidas por los distintos tipos de láser

Diseño experimental I

BM y MO

Inmediatamente después de los disparos con los 4 tipo de láser y en las diferentes configuraciones, se pudo observar lesión en la córnea a simple vista, con tinción de fluoresceína y con BM, aunque en ningún caso se produjo la perforación de la córnea.

Imágenes representativas de BM y la MO correspondiente a los distintos grupos experimentales, de córneas lesionadas con distintos tipos de láser y a distintas configuraciones, y córneas controles, se pueden observar en las figuras **27-30**.

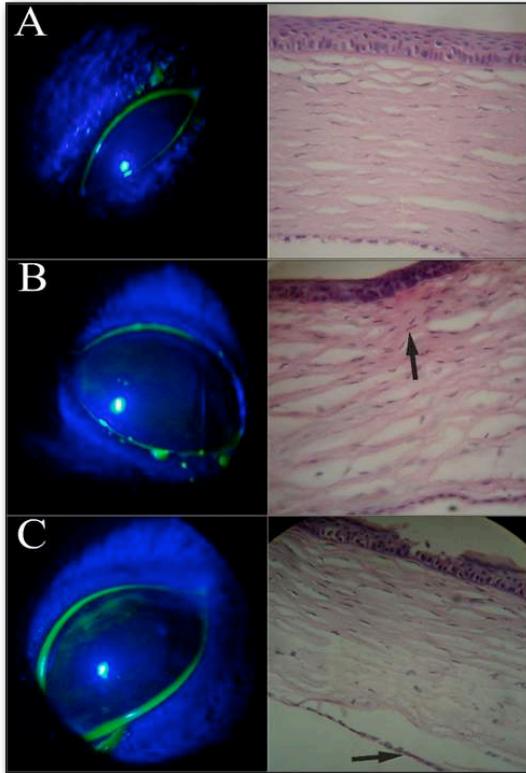


Figura 27: Imágenes representativas de córneas de cobayos. **Izquierda:** BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea control. **B)** Córnea tratada con **láser argón** a 350 mW, con 0,3 s de exposición y 50 μ m de diámetro. **C)** Córnea tratada con **láser argón** a 650 mW, 0,3 s de exposición y 50 mm de diámetro. **Derecha:** Imágenes representativas de microscopia óptica (MO) con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO:40X.

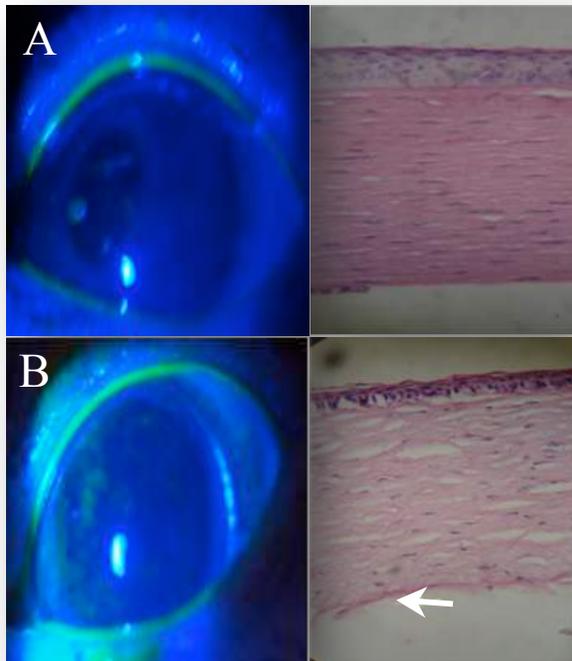


Figura 28: Imágenes representativas de córneas de cobayos. **Izquierda:** BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con **láser CO2** a 300 mW, con 0,3 s de exposición. **B)** Córnea tratada con **láser CO2** a 1 W, 0,3 s de exposición. **Derecha:** Imágenes representativas de MO con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10x. MO:40X.

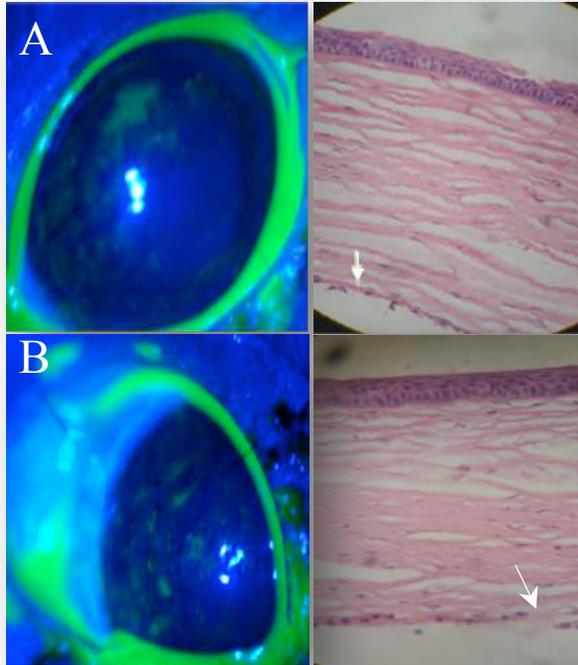


Figura 29: Imágenes representativas de córneas de cobayos. **Izquierda:** BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con **láser Diodo** 900 mW, 0,3 s de exposición. **B)** Córnea tratada con **láser Diodo** 1200 mW, 0,4 s de exposición. **Derecha:** Imágenes representativas de microscopia óptica con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10x. MO:40X.

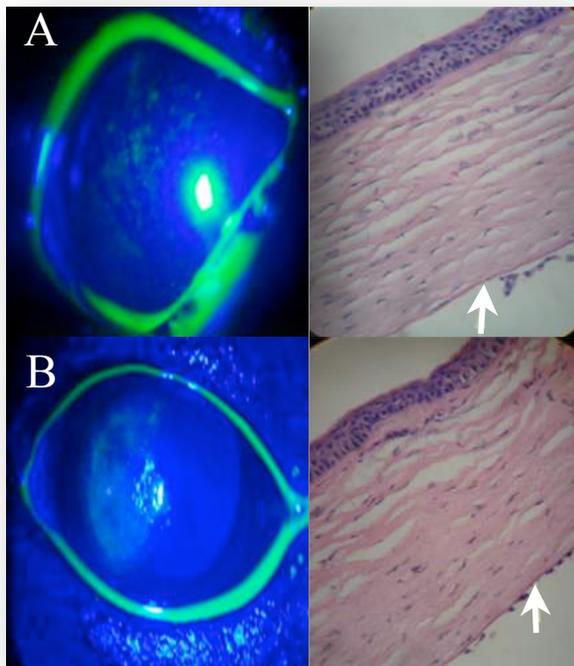


Figura 30: Imágenes representativas de córneas de cobayos lesionadas con láser Nd-YAG. **Izquierda:** BM con tinción de fluoresceína. **A)** Córnea tratada con **láser Nd-YAG** 7,8 mW, 0,2 s de exposición. **B)** Córnea tratada con **láser Nd-YAG** 8,3 mW, 0,2 s de exposición. **Derecha:** Imágenes representativas de MO con tinción de HE. En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño inducido por el láser. BM: 10X. MO:40X.

A continuación, se muestra un resumen de los estudios histopatológicos realizados con las distintas configuraciones de láser utilizadas (**Tablas 10-13**).

Grupo cobayos	Configuración	Daño tisular	
1	350 mW 0,3 s, 50 µm	Epitelio	Deshidratado, quemadura superficial
		Estroma	Leve alteración fibras superficiales
		Endotelio	INDEMNE
2	650 mW 0,3s, 50 µm	Epitelio	Ablacionado
		Estroma	Desorganización estructural, basofilia en fibras colágeno de mitad anterior
		Endotelio	Dehiscencia de capa endotelio de Descemet
3	350 mW 0,4 s, 50 µm	Epitelio	Dehiscencia de la capa Bowman
		Estroma	Alteración estructural de fibras
		Endotelio	Alteración de Descemet
4	650 mW 0,4 s, 50 µm	Epitelio	Dehiscencia de la capa Bowman
		Estroma	Desorganización estructural de fibras
		Endotelio	Alteración estructural

Tabla 10: Daños producidos por láser **argón** estudiados mediante MO.

Grupo cobayos	Configuración	Daño tisular	
1	300 mW 0,3 s	Epitelio	Ablacionado
		Estroma	Leve daño estructural
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial
2	400 mW 0,3s	Epitelio	Dehiscencia de epitelio, de la capa Bowman con vacuolización y citoplasma eosinófilo, condensación de cromatina
		Estroma	Moderado daño estructural
		Endotelio	Alteración disposición celular
3	700 mW 0,4 s	Epitelio	Condensación y disminución de espesor epitelial
		Estroma	Daño moderado del estroma
		Endotelio	Dehiscencia de la Descemet
4	1 W 0,4 s	Epitelio	Dehiscencia del epitelio, de la capa de Bowman, retracción del epitelio y vacuolización de células basales, con disminución del espesor epitelial
		Estroma	Alteración moderada-severa de la arquitectura
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial

Tabla 11: Daños producidos por Láser **CO₂** estudiados mediante MO.

Grupo cobayos	Configuración		Daño tisular
1	900 mW	Epitelio	Vacuolización de células basales, condensación de Bowman, necrosis focal del epitelio
	0,3 s	Estroma	Vacuolización de la sustancia propia estromal
		Endotelio	Endotelio dañado con pérdida de sustancia
2	900 mW	Epitelio	Deshidratación y disminución de espesor, vacuolización de células basales
	0,4s	Estroma	Vacuolización y alteración de todo el estroma
		Endotelio	Dañado con perdida estructural
3	1200 mW	Epitelio	Condensación de epitelio deshidratado
	0,3 s	Estroma	Leve alteración de fibras colágeno
		Endotelio	Dehiscencia por sectores
4	1200 mW	Epitelio	Condensación de epitelio deshidratado, condensación de Bowman por sectores
	0,4 s	Estroma	Hialinización de fibras estromales
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial

Tabla 12: Daños producidos por Láser **diodo** estudiados mediante MO.

Grupo cobayos	Configuración		Daño tisular
1	26 mW	Epitelio	Condensación y daño epitelial
	0,2 s	Estroma	Moderada a severa alteración estructural de fibras de colágeno
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial
2	35 mW	Epitelio	Deshidratación epitelial y condensación sectorial de Bowman
	0,2s	Estroma	Alteración moderada de arquitectura de fibras
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial
3	39 mW	Epitelio	Hipercondensación cromatina basal y condensación de Bowman
	0,2 s	Estroma	Moderada a severa alteración estructural de fibras colágeno
		Endotelio	Pérdida de endotelio sectorial
4	41,5 mW	Epitelio	Vacuolización de epitelio basal, disminución del espesor epitelial
	0,2 s	Estroma	Alteración del sentido de fibras colágeno
		Endotelio	Disminución de número de células

Tabla 13: Daños producidos por Láser **Nd-YAG** estudiados mediante MO.

Solamente en el grupo experimental del láser argón, en el que se utilizó una potencia de 350 mW, con 0,3 segundos de exposición y 50 µm de diámetro de disparo, se observó una lesión epitelial y de estroma superficial, sin daño en el endotelio. El resto de los láseres a diferentes configuraciones

provocaron lesiones muy profundas en la córnea, que incluían alteraciones que llegaban hasta el endotelio.

Diseño experimental II

La observación por BM de las córneas, reveló la presencia de leucomas (lesión corneal que consiste en una mácula de distintos grados de opacidad, que se produce luego de la dehiscencia de la membrana de Bowman). Hubo clara correlación entre persistencia de los leucomas en el tiempo y la potencia de láser argón empleada.

La **tabla 14** resume los resultados cinéticos de la formación y persistencia de leucomas en las córneas tratadas con el láser argón. Con 500 y 400 mW los leucomas se observaron hasta el día 21 luego del tratamiento con láser. Con 350 mW, no se observaron leucomas en el día 21, solo llegaron a verse hasta el día 14. Con 300 y 150 mW los leucomas ya no se observaron en el día 7, es decir que se vieron por 18 h. Con 100 mW los leucomas desaparecieron a las 18 h.

La duración de los leucomas estuvo directamente relacionada con las intensidades de láser argón utilizada.

Potencia \ Tiempo	500 mW (7)	400 mW (7)	350mW (7)	350mW (15)	300mW (7)	150mW (7)	100mW (7)
1 hora	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma
18 horas	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Córnea Clara
7 días	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Córnea Clara	Córnea Clara	Córnea Clara
14 días	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Leucoma	Córnea Clara	Córnea Clara	Córnea Clara
21 días	Leucoma	Leucoma	Córnea Clara	Córnea Clara	Córnea Clara	Córnea Clara	Córnea Clara

Tabla 14: Formación de leucomas sobre la córnea, cuando se aplican diferentes potencias de láser argón (500 mW, 400 mW, 350 mW, 300 mW, 150 mW y 100 mW). Entre paréntesis se indica el número de disparos.

Por mediciones realizadas con OCT Visante se observó un adelgazamiento significativo del espesor corneal a la hora del tratamiento ($p < 0,05$) en los animales tratados con 500, 400, 350 y 300 mW y 15 disparos, con respecto al grupo control.

A los 7 días se observó una completa recuperación del espesor corneal. La **tabla 15** muestra los espesores corneales en los diferentes grupos obtenidos a los diferentes tiempos post-tratamiento, y los asteriscos indican diferencia significativa con respecto al espesor de la cornea control.

Control	500	400	350 (7)	350 (15)	300	150	100	Tiempo
245,33 ± 4,73	*178,33 ± 23,35	*192,67 ± 12,74	243,00 ± 5,66	*223,67 ± 7,63	*215,67 ± 8,32	235,00 ± 2,65	229,67 ± 13,50	1 hora
	243,67 ± 7,32	230,33 ± 6,11	231,67 ± 16,17	* 202,50 ± 7,58	223,33 ± 6,51	254,50 ± 2,12	226,00 ± 14,93	18 horas
	236,33 ± 2,08	233,00 ± 9,17	240,33 ± 5,03	230,67 ± 8,39	239,00 ± 5,29	252,33 ± 2,08	243,67 ± 5,03	7 días
						237,67 ± 1,15	241,33 ± 8,14	14 días
								21 días

Tabla 15: Resultados de la medición del espesor corneal en μm , utilizando OCT Visante (media y SEM) en diferentes tiempos y con diferentes potencias de láser argón.

Diseño experimental III

En este estudio los OI de 7 cobayos sanos fueron expuestos a 15 disparos del láser argón con una potencia de 350 mW, 0,3 segundos de exposición y 50 μm de spot. Los OD de dichos animales se utilizaron como controles.

Se observó y registró la presencia de **leucomas** en todos los animales a partir de la primera hora posterior a la aplicación del láser. A medida que fue pasando el tiempo, las córneas se recuperaron gradualmente y los leucomas fueron desapareciendo hasta no observarse en el día 15. (**figura. 31**).

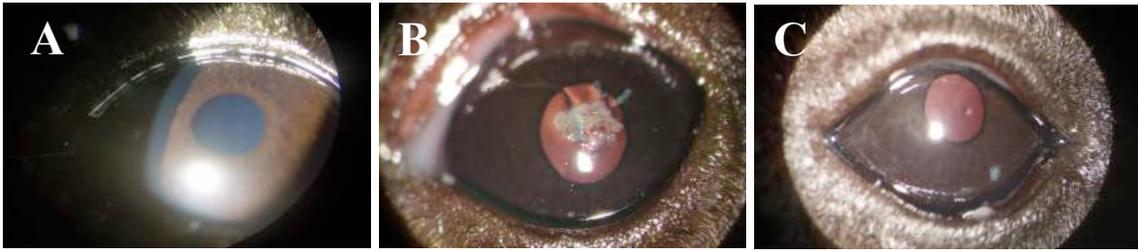


Figura 31: Imágenes representativas de BM de córneas de cobayos. **A)** córnea control, **B)** 1 h post-tratamiento con láser argón, se pueden apreciar los leucomas en la zona central de la córnea, donde se efectuaron los disparos (configuración, ver diseño experimental III) y **C)** 15 días posteriores a la aplicación del laser, la córnea presenta un aspecto normal. Magnificación: 10X

Con OCT Visante se observó en OI, un adelgazamiento (no significativo, $p > 0,05$) de la córnea a la hora post tratamiento con láser con respecto a los OD (controles). Las córneas lesionadas recuperaron su espesor al día 7 post tratamiento (**figura 32**).

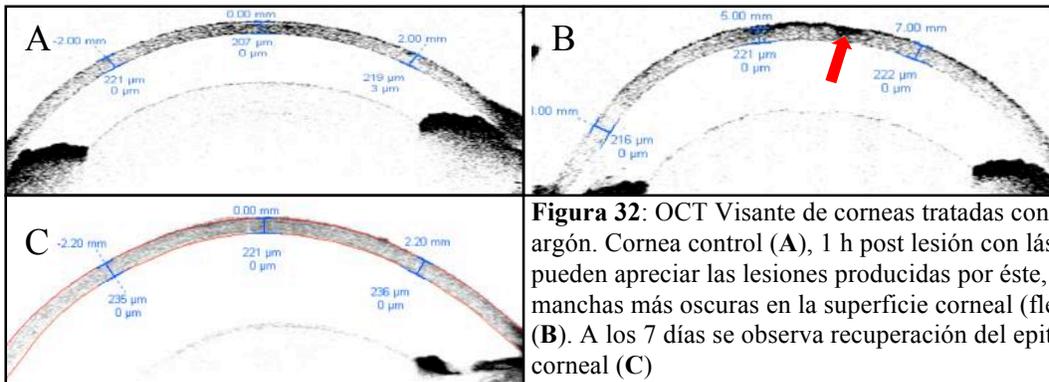


Figura 32: OCT Visante de corneas tratadas con láser argón. Cornea control (**A**), 1 h post lesión con láser, se pueden apreciar las lesiones producidas por éste, como manchas más oscuras en la superficie corneal (flecha) (**B**). A los 7 días se observa recuperación del epitelio corneal (**C**)

Por MO se evaluó el tipo y cantidad de infiltrado leucocitario de manera semicuantitativa, en el estroma superficial. En todos los casos la documentación de las observaciones se realizó mediante microfotografías obtenidas con cámara Nikon Sight DS-U, A.G. Heinze Inc, Tokyo, Japón, adosada al microscopio.

Como se muestra en la **figura 33**, no hubo células inflamatorias en las córneas controles, pero sí se observó un incremento de leucocitos mononucleares en el estroma anterior de córneas lesionadas a las 48 hs, 96 hs y aún a los 7 días.

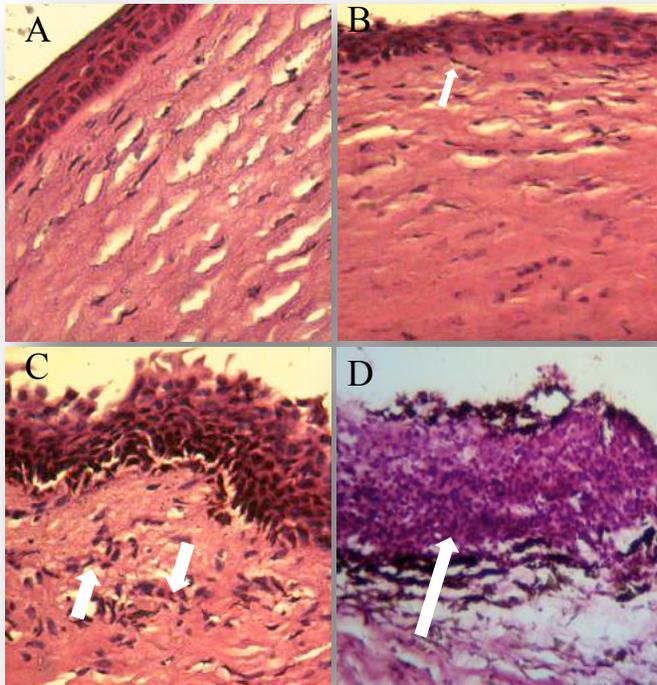


Figura 33: Imágenes representativas de MO con tinción de HE, de córnea de cobayos: **A)** control, **B)** leve infiltrado leucocitario mononuclear a 48 h **C)** moderado infiltrado a las 96 h y **D)** intenso infiltrado a los 7 días post lesión con láser. Flechas señalan infiltrado leucocitario mononuclear.

Por ME, las córneas del grupo **control** mostraron un epitelio estratificado no queratinizado típico y un estroma anterior con queratocitos rodeados de matriz extracelular y fibras de colágeno regularmente ordenadas (**figura 34 A**).

Las córneas tratadas con láser, estudiadas a 1 h post tratamiento, exhibieron un epitelio extremadamente dañado, con células picnóticas. Luego de una semana, el epitelio corneal todavía presentaba algunas células picnóticas, pero había comenzado a recuperarse, para mostrar una ultraestructura normal hacia los 15 días (**figura 34 B**). Durante los primeros 7 días, el estroma presenta anomalías. Existen queratocitos atípicos, algunos de ellos agrupados, con membranas celulares dilatadas y con citoplasma con zonas vacuolizadas y otras zonas de citoplasma condensado. La matriz extracelular se mostró bastante desorganizada (**figura 34 C**). En el día 15 post-tratamiento, el estroma corneal y los queratocitos eran de aspecto normal, y las fibras de colágeno se encontraron bastante organizadas (**figura 34 D**).

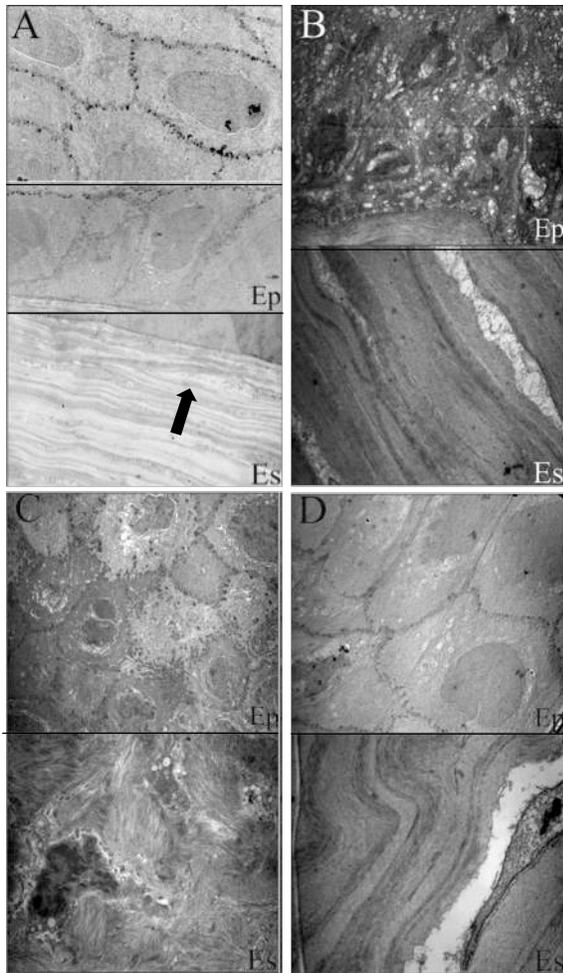


Figura 34: Imágenes representativas de la ultraestructura de **córneas control**, obtenidas por ME
(A) epitelio estratificado intermedio (superior), capa basal del epitelio estratificado de aspecto columnar (intermedio) y el estroma anterior muestra el arreglo regular de las fibrillas colágenas características del mismo (paralelas entre sí), rodeando un queratocito (flecha).
(B) 1 h post-tratamiento en el epitelio se observan varias células picnóticas (superior), en estroma aún no se observan cambios
(C) 7 días post-tratamiento. El epitelio muestra algunas células picnóticas (superior). En el estroma se observan miofibroblastos y una matriz extracelular bastante desorganizada (inferior).
(D) 15 días post-tratamiento. Epitelio y estroma se muestran recuperados.
 Epitelio (Ep), estroma (Es).
 Magnificación: (A) 3000X, (B superior) 3000X y (B inferior) 6000X; (C superior) 3000X y (C inferior) 4600X; (D superior) 4000X y (D inferior) 6000X.

Los niveles de MMP-9 y MMP-10 fueron evaluados por WB, a diferentes tiempos, luego de la lesión inducida en la córnea de animales de este grupo experimental (**figura 35**).

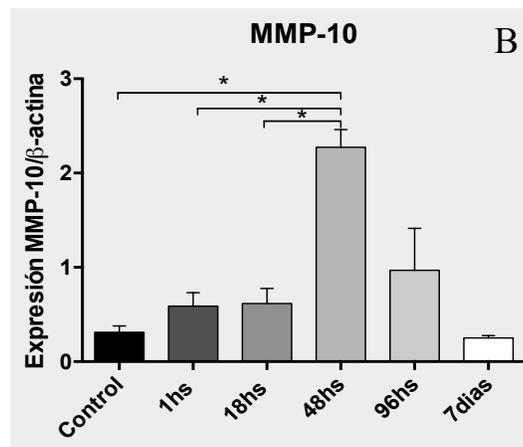
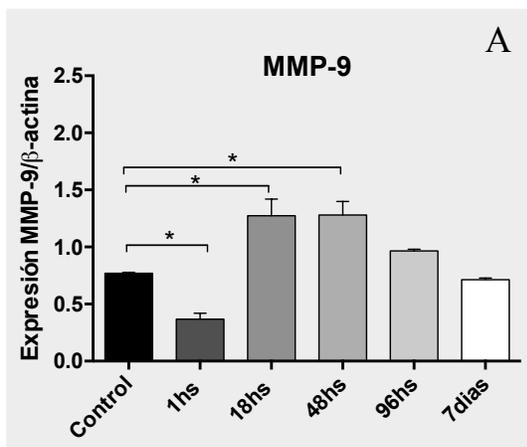


Figura 35: Cinética de la expresión de MMP-9 (A) y MMP-10 (B) posterior al tratamiento con láser argón, determinada mediante WB (*:p<0,05).

Como se puede observar en la **figura 35** los niveles de MMP- 9 aumentaron significativamente con respecto al control ($p < 0,05$) hacia las 18hs post tratamiento, manteniéndose elevada hasta las 48 hs y retornando luego a niveles basales hacia el día 7.

En el caso de MMP-10, ésta se elevó significativamente ($p < 0,05$) a las 48 hs post tratamiento y volvió a valores basales hacia el día 7.

Diseño experimental IV

En las córneas erosionadas con fresa no se registró presencia de **leucomas**, como en los animales tratados con láser. Se puede apreciar la disrupción del epitelio corneal, puesto en evidencia por los bordes de la lesión, a la hora post tratamiento, tanto para fresado superficial (FS) como para fresado profundo (FP). Las córneas se recuperaron gradualmente hacia el día 7 (**figura 36**).

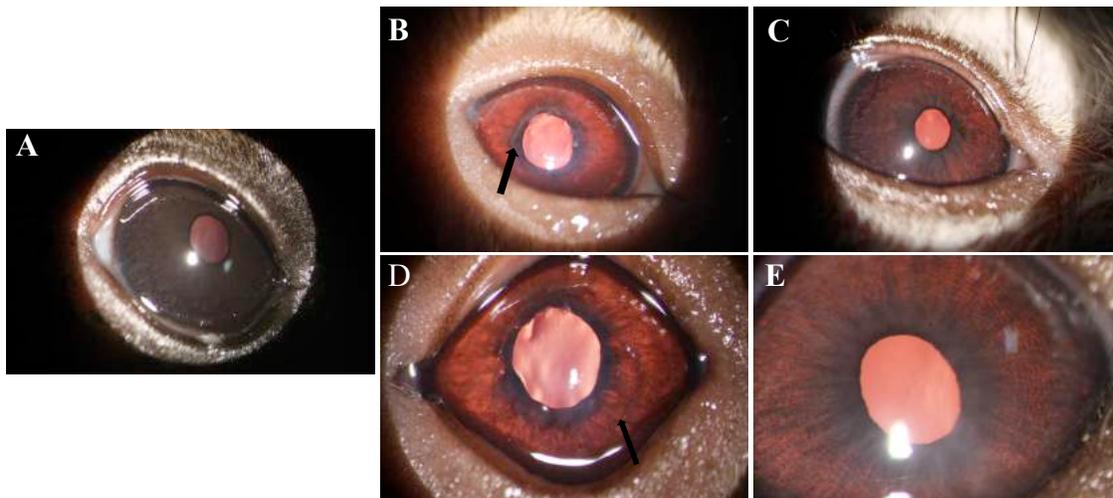


Figura 36: Imágenes representativas de BM de corneas de cobayos. **A)** córnea control, **B)** 1 h post-tratamiento con FS, y **C)** 7 días posteriores a la aplicación de fresado superficial (FS), la córnea presenta un aspecto normal. **D)** 1 h post erosión con fresado profundo (FP) y **E)** 7 días post-tratamiento, la córnea se observa recuperada. Las flechas indican los bordes de la lesión Magnificación: 10X

Con OCT Visante se observó en OI, un adelgazamiento de la córnea a la hora post- tratamiento con respecto a los OD (controles) y este adelgazamiento fue más pronunciado en las córneas tratadas con FP. Las córneas lesionadas recuperaron su espesor al mismo tiempo y hacia el día 7 luego de las erosiones provocadas por la fresa (**figura 37**).

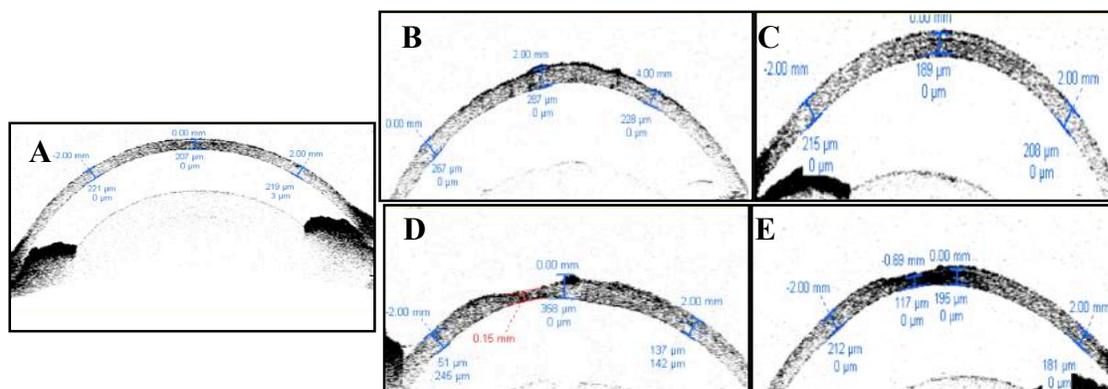


Figura 37: OCT Visante de córneas erosionadas con fresa rotativa. **A)** córnea control, **B)** córnea tratada con fresado superficial (FS), 1 h post, se observan las lesiones en epitelio como manchas más oscuras, **C)** a los 7 días la córnea se encuentra recuperada. **D)** 1h post- tratamiento con fresado profundo (FP), se aprecia la lesión como una zona de “valle” en la superficie corneal y **E)** 7 días post erosión, la córnea aun no está recuperada completamente.

Al igual que en el grupo tratado con láser, se evaluó el tipo y cantidad de infiltrado leucocitario de manera semicuantitativa en el estroma superficial mediante MO.

En el caso de las córneas erosionadas con FS, el examen de los cortes histológicos indicó ausencia de proceso inflamatorio en las córneas controles. A la hora post erosión se puede apreciar la zona de lesión en el epitelio corneal y a las 48 hs se registró la existencia de un moderado infiltrado mononuclear, con algunos eosinófilos y regeneración epitelial. A los 7 días luego del tratamiento, el epitelio se encuentra re-epitelizado (**figura 38 A, B y C**).

Las córneas lesionadas con FP muestran un infiltrado de eosinófilos y polimorfonucleares (PMN) a la hora post tratamiento, que disminuye notablemente hacia las 48 hs, momento en el cual se aprecia una recuperación del epitelio. A los 7 días se observa un epitelio hiperplásico, que está prácticamente recuperado (**figura 38 D, E y F**).

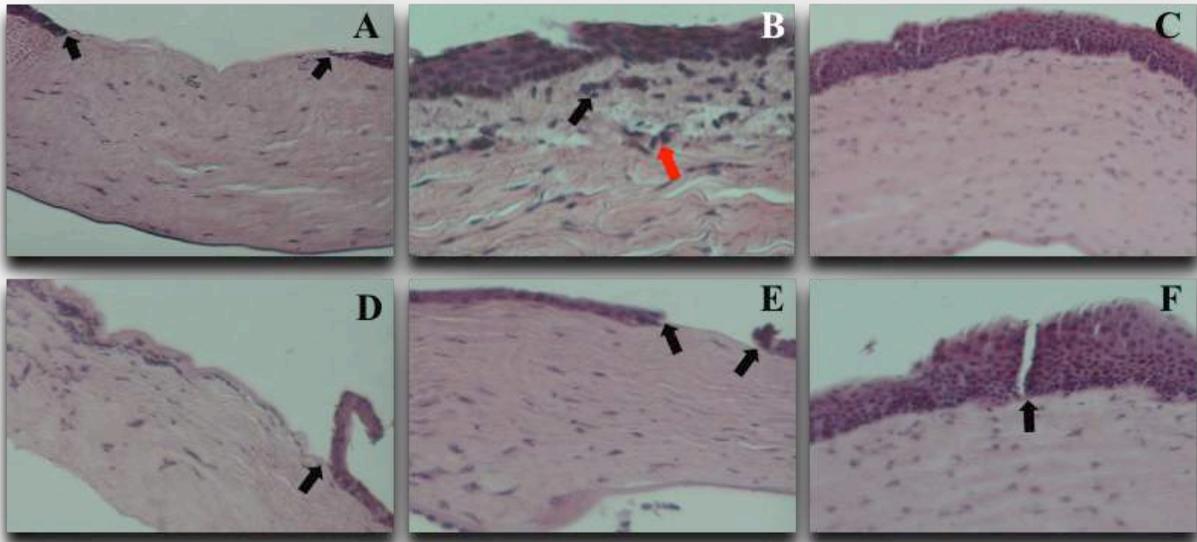


Figura 38: Imágenes representativas de MO en córnea de cobayos, teñidas con H&E. **A)** a la hora posterior a la erosión con fresado superficial (FS) se observa el sitio de lesión en el epitelio corneal (flechas), **B)** a las 48 h se observa un infiltrado leucocitario moderado (flecha negra), con algunos eosinófilos (flecha roja), **C)** a los 7 días la córnea se encuentra reepitelizada. **D)** zona de deshisencia del epitelio tratado con fresado profundo (FP) (flecha), y leve infiltrado de polimorfonucleares (1h post), **E)** zona de regeneración epitelial (flechas) a las 48 h post FP y **F)** epitelio hiperplásico, prácticamente recuperado a los 7 días post-tratamiento. Magnificación: 40X

Los niveles de gelatinasa MMP-9 fueron evaluados por WB, a diferentes tiempos, luego de lesiones provocadas (modo FS y FP). (**figura 39, panel izquierdo**).

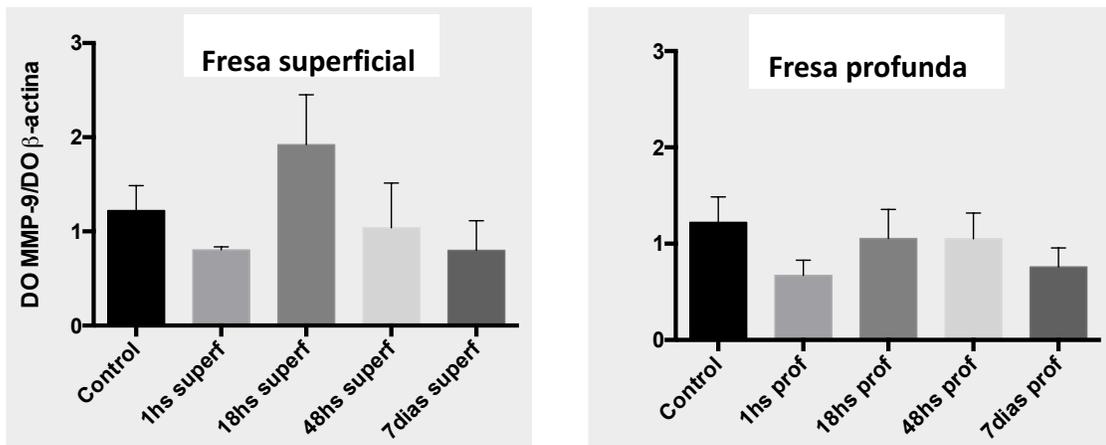


Figura 39: Cinética de la expresión de MMP-9 luego del tratamiento con FS (panel izquierdo) y FP (panel derecho), determinada mediante WB.

Los niveles de MMP- 9 en las córneas erosionadas con FS aumentaron (aunque no significativamente) con respecto al control ($p > 0,05$) hacia las 18hs post tratamiento, retornando luego a niveles basales hacia el día 7.

En el caso del epitelio corneal tratado con FP, esta gelatinasa solamente demostró un ligero aumento con respecto al control (no significativo) y sus niveles de expresión volvieron a niveles basales hacia el día 7 post tratamiento (**figura 39, panel derecho**).

DISCUSIÓN

El objetivo de esta parte de la tesis consistió en investigar las lesiones inducidas por cuatro tipos diferentes de láser, que fueron disparados sobre el epitelio de córneas de cobayos en diferentes configuraciones, y estudiar los tiempos de recuperación y la existencia o no de lesiones permanentes en este tejido ocular. Estudios similares fueron realizados erosionando la córnea de estos animales a diferentes profundidades mediante la utilización de una fresa de uso oftalmológico.

La elección del animal adecuado para estos estudios de lesión y recuperación corneal no es menos importante que la selección del instrumento a utilizar. La investigación de la cicatrización corneal ha hecho uso de varios animales, desde animales de laboratorio hasta animales domésticos de compañía, reconociendo que cada uno tiene ventajas y desventajas. En 1944, Friedenwald y Buschke examinaron la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en el epitelio de las córneas de ratas sanas y con lesiones por desbridamiento (219). Los estudios que utilizaron ratas a partir del periodo comprendido entre 1970 y 1990 dieron información importante sobre las proteínas y moléculas que regulan el metabolismo, la adhesión y la migración de células epiteliales en la córnea (195, 220).

Los conejos tienen una córnea similar en tamaño a la del hombre; esto permite a los médicos especialistas utilizar los mismos instrumentos y métodos de evaluación que utilizan en los pacientes. Los modelos en conejo fueron fundamentales en los estudios que condujeron a la implementación clínica de los procedimientos de PRK y LASIK (206). La córnea del conejo responde de manera similar a la córnea humana en términos de la sincronización, el grado de cicatrización, y formación de miofibroblastos (208). Las desventajas de realizar investigaciones en conejos incluyen mayor costo que las ratas para la compra y mantenimiento, disponibilidad restringida de anticuerpos contra

diversas proteínas de interés, y menor disponibilidad de cepas genéticamente diversas y animales transgénicos.

Hasta donde conocemos, los cobayos no han sido muy utilizados para estudios de recuperación de la córnea luego de lesiones que llegan al estroma superficial. El cobayo es un animal dócil, de tamaño pequeño, no muy costoso para criar, y posee una córnea morfológicamente similar al humano (9). Además, el cobayo, a diferencia de otros roedores y al igual que los humanos, no puede sintetizar AA a partir de glucosa, por lo cual ambas especies deben incorporarlo con la dieta para evitar los serios problemas de salud que causa el déficit de esta vitamina. Aplicaciones del láser de CO₂ en córnea humana, bovina, porcina y de conejo han demostrado cambios en el epitelio y en el estroma cuando las córneas se examinaron por MO (213-214). Si bien la aplicación de este tipo de láser no perforó la córnea de cobayos en nuestro estudio, fue capaz de inducir importantes daños en todas las estructuras del tejido corneal.

Otro láser que empleamos en nuestra investigación fue el láser de Nd-YAG, que es utilizado para resolver la opacificación de la cápsula posterior, que puede ocurrir luego de la facoemulsificación (técnica quirúrgica utilizada para la operación de cataratas, en la que se extrae el cristalino luego de su fragmentación en pequeñas partículas y posterior colocación de una lente intraocular), mediante una capsulotomía posterior (218).

El láser argón, que se diferencia en su mecanismo de acción con respecto al excímer láser, fue también utilizado en este trabajo para estudiar la lesión producida en córneas de cobayos (221) y posteriormente fue evaluado para investigar el tiempo y calidad de la recuperación de las córneas en cobayos normales. Además de emplearse frecuentemente en la fotocoagulación en diversas enfermedades de la retina, ha sido utilizado con otras finalidades en oftalmología. Vieira y col., emplearon este láser haciendo foco a nivel intraestromal, para seccionar suturas de la córnea, con una potencia de 340 mW, 0,1 s, y diámetro de disparo de 5 a 100 μ m, sin observar úlceras ni infecciones (211). Kremer y col., encontraron que el láser argón a potencias y tiempos variados induce, en córneas de cobayos teñidas con rosa de bengala como fotosensibilizador, desde un mínimo daño, hasta una importante disrupción lamelar (212). Resultados similares fueron observados en nuestros estudios cuando aplicamos este láser con diferentes configuraciones, sobre córneas de cobayos teñidas con fluoresceína.

El láser de diodo se utiliza, entre otras cosas, para el tratamiento de la retinopatía del prematuro y glaucoma (218). Chew et al., utilizando láser de argón y diodo, compararon la transmisibilidad de córneas humanas y los efectos fototérmicos sobre córnea e iris. Utilizaron córneas claras, intermedias

y opacas, e hicieron foco en estroma medio (217). El láser diodo no produjo daño térmico en la córnea, y las diferencias con respecto a nuestros resultados pueden deberse a la utilización de distintos tipos de córneas y a la configuración del láser diodo. Estos autores concluyeron que el láser diodo podría ser el ideal para la iridotomía/iridoplastia en glaucoma de ángulo cerrado agudo.

En esta primera parte de nuestro trabajo buscamos qué tipo de láser y en qué condiciones de aplicación dañaban solamente la córnea desde el epitelio hasta la porción anterior del estroma. Debido a que únicamente el láser de argón a 350 mW, aplicado por 0,3 s, y con 50 μm de diámetro de disparo, lesionó solamente la porción anterior de la córnea, continuamos los estudios de recuperación de la córnea utilizando solamente este tipo de láser y en esas condiciones de aplicación.

Posteriormente buscamos y pusimos a punto métodos que permitieran estudiar las lesiones (tanto *in vivo* como *in vitro*) y su posterior recuperación luego de la aplicación en un único momento del láser argón.

La BM se utilizó para ver el segmento anterior del ojo (conjuntiva, córnea, cámara anterior, iris y cristalino), específicamente para evaluar la apariencia corneal, en córneas lesionadas o no, con la configuración previamente elegida de láser argón en animales normales.

Otro aparato que utilizamos para la observación de la córnea *in vivo*, fue OCT Visante, siendo nuestro equipo de trabajo el primero en utilizar esta tecnología en la investigación del segmento anterior en cobayos.

Pudimos desarrollar lesiones de la porción anterior en córneas de cobayos de manera reproducible mediante la aplicación de 15 disparos de este láser a la configuración previamente descrita (221).

Los estudios sobre recuperación de heridas provocadas en la córnea tienen una larga historia, ya que comenzaron hace aproximadamente siete décadas. Desde que Friedenwald y Buschke en el año 1944 publicaron uno de los primeros trabajos acerca de la recuperación del epitelio corneal luego de erosiones inducidas por aguja en córnea de rata (219), muchos otros estudios han sido realizados describiendo distintos tipos de erosiones (químicas o mecánicas) y cómo se produce la recuperación de la córnea. La respuesta de cicatrización corneal es una compleja interacción entre células estromales, epiteliales e inmunes, en la cual participan activamente citocinas, factores de crecimiento y sus receptores (201).

Para estudiar las variaciones en la respuesta de la córnea de diferentes animales a los distintos tipos de erosiones, e investigar mecanismos celulares de migración, proliferación, y diferenciación, como también mecanismos de barrera, cicatrización, e inflamación, entre otros, se han empleado diversos instrumentos para generar lesiones. Las ventajas de utilizar los distintos tipos de lesiones,

así como los conocimientos obtenidos del empleo de cada uno de ellos sobre los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de cicatrización, han sido recientemente publicados en una revisión de Stepp y col., (193). Entre los instrumentos más usados para producir lesiones corneales, se encuentran la espátula roma (191) y la fresa rotativa (192, 210). En las heridas por desbridamiento, la membrana basal queda sobre el estroma mientras que en las heridas por queratectomía, se elimina (192).

En nuestro modelo experimental lesionamos la córnea de cobayos en forma térmica utilizando láser de argón, o en forma mecánica usando la fresa rotativa. En el primer caso dañando epitelio, membrana de Bowman y estroma superficial, y en el segundo caso dañando epitelio únicamente (FS) o lesionando epitelio, membrana de Bowman y estroma superficial (FP). Por MO pudimos observar que en epitelio los daños más frecuentes fueron condensación, vacuolización y disminución del espesor y en el estroma, alteración de la disposición de las fibras colágeno y, en algunos casos, vacuolas en la matriz extracelular.

Pal-Ghosh y col. (222), comparando la lesión producida por la espátula roma y la fresa rotativa, encontraron una rápida respuesta mediada por los leucocitos residentes y reclutados, sobre todo cuando se lesionaba la córnea con una espátula roma, hallando un aumento de leucocitos CD45+ en el borde de la herida, 3 a 6 hs después de la lesión. En pocos minutos, los leucocitos cambian su forma en el estroma expuesto, observándose células más redondas, preparadas para migrar. En 6 hs luego de la lesión con espátula roma, aumenta el reclutamiento de monocitos y células $\gamma\delta T$, mientras que la lesión con fresa rotativa provoca menor respuesta y activación celular debido a la remoción de citoquinas de la superficie estromal.

En 24 h, una herida de 1,5 mm hecha en un ratón adulto, está cerrada. En cuestión de horas después de la herida, los leucocitos residentes se activan y reclutan más leucocitos que entran en el estroma desde la vasculatura del limbo (223-224). En nuestro modelo experimental de lesión con láser argón también hallamos acumulación de leucocitos mononucleares que varió desde leve a moderada para terminar siendo intensa luego de una semana de la inducción de la lesión corneal. En el estudio de lesiones producidas con fresa rotativa, sólo en el caso de la fresa superficial se observó un infiltrado mononuclear moderado que se resolvió hacia el día 7. Cuando las córneas fueron tratadas con fresa de modo tal que se eliminó la membrana de Bowman, no se observó infiltrado leucocitario, a diferencia de lo observado posterior al tratamiento con laser argón y fresa superficial.

Las heridas por desbridamiento no activan la expresión de α -SMA en los fibroblastos del estroma en el ratón. Se deben realizar heridas más profundas, que alteren la membrana basal, tales

como la queratectomía y las incisiones de espesor completo, para evaluar la formación de miofibroblastos (192, 210). Las células positivas a α -SMA que se generan por este tipo de heridas son transitorias. Permanecen durante varias semanas antes de desaparecer (201, 225).

Si bien nosotros no estudiamos la expresión de α -SMA en los fibroblastos estromales, los estudios de ME en las córneas de cobayos lesionados por el láser argón mostraron la presencia de células en el estroma compatibles con miofibroblastos.

Después de una lesión corneal, se dispara una serie de eventos en cascada mediados por interacciones autócrinas y parácrinas de citoquinas, producidas por distintos tipos de células que intentan restaurar la estructura dañada sin dejar secuelas. Las lesiones que involucran sólo al epitelio curan por migración, mitosis y diferenciación de células, sin dejar cicatriz. Si, en cambio, se lesiona la membrana basal, la transparencia corneal puede verse afectada. La apoptosis de los queratocitos libera enzimas proteolíticas que dañan la matriz extracelular y el tejido alrededor de las células (226). Algunos queratocitos quedan en el estroma periférico y posterior (profundo) y comienzan a sufrir mitosis 12 a 24 hs después de la lesión. Esta proliferación genera precursores de miofibroblastos. Cuando hay muchos miofibroblastos, la opacidad de las células y la matriz extracelular desorganizada que ellos producen puede generar una opacidad corneal. Los miofibroblastos tienen características de células musculares lisas, como actina del músculo liso α -SMA, que se puede usar como marcador.

Los miofibroblastos expresan pocas cristalinas corneales, como la transquetolasa y la ALDH1, comparado con los queratocitos normales. La producción disminuida de cristalinas lleva a la opacidad. El factor TGF- β es clave en el desarrollo de los miofibroblastos; estimula la producción de proteínas de la MEC, inhibe las MMPs y modula la respuesta cicatrizal. Los factores TGF- β 1 y 2 favorecen la cicatrización, mientras que el tipo 3 la retrasa (227). Durante la cicatrización de la herida corneal aumenta la expresión del factor IGF2R (insulin like growth factor 2 receptor) en los miofibroblastos estromales, que regula la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Los queratocitos son los encargados de producir el colágeno y la MEC, pero cuando cambian a miofibroblastos por los factores antes enunciados, tanto las proteínas como los proteoglicanos y glucosaminoglicanos, se modifican. El estroma corneal es una estructura altamente organizada que necesita producir la mínima dispersión de la luz para contribuir a la transparencia corneal (1). Las anomalías en la organización del colágeno resultan en una pérdida de la transparencia corneal (25, 26).

Las MMP-2 y MMP-9 participan en la cicatrización de heridas de la córnea, y en la patogénesis de enfermedades inflamatorias de la misma (228). El aumento de la MMP-9 está asociada a la falla en la reepitelización porque favorece la desintegración de la membrana basal. Después de 18 hs de una lesión corneal, la MMP- 9 aparece en el frente de migración epitelial, le siguen la MMP-10 detrás y la MMP-13 en toda la zona de la herida. Cuando se cierra completamente la herida en 24 hs, se observa sobreexpresión de la MMP-1a, 1b y 13 y aumenta la expresión de la MMP-9. Luego de 24 hs no se encuentran MMP-9, ni MMP-10 ni la MMP-12 (197). Durante el proceso de reepitelización están aumentadas las MMPs y las TIMP. La MMP-9 tiene un papel importante en la modulación de la dinámica celular, pues afecta moléculas de señalización en el microambiente celular y se necesita para remover la matriz provisoria sobre la cual migran las células epiteliales (197, 229).

Los valores de MMPs hallados en nuestra investigación mostraron, en general, tanto para las córneas tratadas con láser como con fresa (aumento significativo en el primero caso, y no significativo para el segundo tipo de erosión), una elevación de MMP-9 entre las 18 hs y 48 hs, con una posterior disminución hasta llegar en 7 días a niveles basales. Resultados similares a los nuestros, pero estudiando RNA mensajero para MMP-9 en ratones, fueron reportados hace unos años por el grupo de la Dra. Fini (197). En el caso de MMP-10, medida sólo en las córneas tratadas con láser, se observó un comportamiento similar a la MMP-9.

Estos estudios nos permitieron demostrar que las córneas de cobayos erosionadas con los distintos métodos (laser argón o fresa rotativa) poseen una extraordinaria capacidad para regenerarse entre los 7 y 15 días posteriores de producirse las lesiones sin dejar alteraciones morfológicas.